

丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

陈琳, 梁江红, 魏麓云

(南华大学附属第二医院神经内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 丹红注射液; 缺血再灌注损伤; 高尔基矩阵蛋白 130; 高尔基体

[摘要] **目的** 通过建立脑缺血再灌注损伤模型并以丹红注射液进行干预, 观察损伤区域脑组织细胞形态学及高尔基体形态学变化, 检测高尔基矩阵蛋白 130(GM130)表达情况, 探讨丹红注射液对脑缺血再灌注损伤保护作用的机制。**方法** 健康成年 SD 大鼠 72 只, 随机分为正常对照组(6 只)、假手术组(6 只)、缺血再灌注组(30 只)和丹红干预组(30 只), 缺血再灌注组和丹红干预组根据缺血 2 h 后再灌注时间的长短分为 6 h、24 h、48 h、72 h、7 天共 5 个亚组, 每个亚组 6 只。脑缺血再灌注模型成功后, 丹红干预组从恢复再灌注开始(即缺血 2 h 后)腹腔注射丹红注射液(8 mL/kg, 每天一次), 直至各时间点处死; 缺血再灌注组在相同时间点腹腔注射同等剂量生理盐水。**结果** 形态学结果显示丹红干预 7 天组较其它各组皮质神经细胞存活数量明显增多, 损伤程度最轻; 在缺血再灌注 7 天组中, 高尔基体形态发生明显受损改变, 网状结构缺失, 淡染, 颗粒减少或消失, 甚至有些出现断裂, 而丹红干预 7 天组高尔基体形态基本正常。GM130 表达随缺血再灌注时间的延长而递减, 随丹红注射液干预时间的延长而递增, 丹红干预 7 天组 GM130 表达明显高于其余各时间点组($P < 0.05$)。**结论** 丹红注射液可能通过上调 GM130 表达而维持高尔基体稳定性, 从而发挥神经保护作用。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Protective Effect of Danhong Injection on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

CHEN Lin, LIANG Jiang-Hong, and WEI Lu-Yun

(Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Danhong Injection; Ischemia-Reperfusion Injury; Golgi Matrix Protein 130; Golgi

[ABSTRACT] **Aim** Establishing model of cerebral ischemia-reperfusion injury and intervening with Danhong injection, then observing morphological changes of cerebral cell in damaged area and Golgi, detecting Golgi Matrix Protein 130 (GM130) expression, and exploring protective mechanism of Danhong injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** 72 healthy adult SD rats were randomly divided into normal controlled group (6), sham operation group (6), ischemia-reperfusion group (30), and Danhong intervention group (30). According to the reperfusion time after ischemia 2 h, sham operation group and ischemia-reperfusion group were respectively divided into 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 7 days five subgroups, there were 6 rats in each subgroup. After the success of cerebral ischemia-reperfusion model, the rats in Danhong intervention group were intervened with Danhong injection(8ml/kg, QD) by intraperitoneal injection from the recovery of reperfusion until they were executed; At the same time, the rats in ischemia-reperfusion group were treated with the same dose of normal saline by intraperitoneal injection. **Results** Morphology showed cortical neuronal survival number were significantly increased in Danhong intervention 7 d group compared with the other groups, and the damage degree was the lightest; In ischemia-reperfusion injury 7 d group, Golgi morphology took significantly impaired change, lack of network structure, lightly staining, granules decreasing or disappearing, and even some broken, but in Danhong intervention 7 d group, Golgi morphology kept normal. GM130 expression decreased with the prolongation of ischemia-reperfusion time, increased with the prolongation of Danhong injection intervention time. GM130 expression of Danhong intervention 7 d group was the highest compared with the other groups($P < 0.05$). **Conclusion** Danhong injection may maintain the Golgi stability through the up-regulation of GM130 expression, and thus play a neuroprotective role.

[收稿日期] 2011-08-30

[作者简介] 陈琳, 硕士, 主治医师, 研究方向为脑血管病基础与临床, E-mail 为 liangjianghong110@163.com。通讯作者魏麓云, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管病基础与临床。

有研究表明脑缺血后高尔基体形态会发生改变,并且随时间延长而加重^[1]。高尔基矩阵蛋白130(GM130)是高尔基体顺面网状结构一个重要的基质蛋白,参与高尔基体堆的形成,维护高尔基体结构的完整,可作为高尔基体结构定位的标记物^[2]。GM130作为高尔基体基质蛋白,与脑缺血再灌注损伤是否存在相关性,国内外尚未见报道。丹红注射液是由丹参和红花配比成的中成药制剂,主要成分包括丹参酮、丹参酚酸和红花黄色素等。大量研究发现丹红注射液对脑缺血再灌注损伤有神经保护作用,但其具体作用机制不甚明确。本实验拟通过建立大鼠大脑中动脉闭塞的脑缺血再灌注损伤模型并以丹红注射液进行干预,观察损伤区域脑组织细胞学形态及高尔基体形态学变化,检测GM130表达情况,探讨丹红注射液的神经保护作用是否与调节GM130的表达而维持高尔基体稳定有关。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

健康成年SD大鼠72只,雌雄不拘,体重260~280g,由南华大学实验动物中心提供。抗GM130多抗由美国Protein Tech公司提供,丹红注射液由菏泽步长制药有限公司提供。

1.2 动物分组及给药方法

将动物随机分为正常对照组(6只)、假手术组(6只)、缺血再灌注组(30只)和丹红干预组(30只)。缺血再灌注组和丹红干预组根据缺血2h后再灌注时间的长短分为6h、24h、48h、72h、7天共5个亚组,每个亚组6只。脑缺血再灌注模型成功后,丹红干预组从恢复再灌注开始(即缺血2h后)腹腔注射丹红注射液(8 mL/kg,每天一次),直至各时间点处死;缺血再灌注组在相同时间点腹腔注射同等剂量生理盐水。

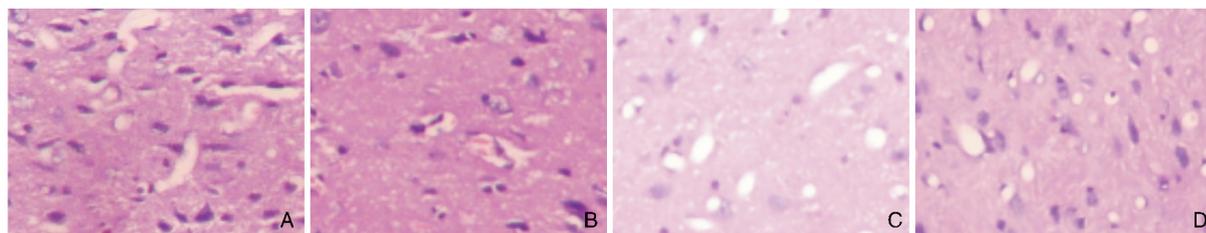


图1. 大鼠脑缺血再灌注及丹红注射液干预后海马CA1区神经细胞HE染色结果($\times 200$) A为假手术组,B为缺血再灌注48h组,C为缺血再灌注7天组,D为丹红干预7天组。

Figure 1. HE staining of hippocampal CA1 nerve cells in rats received ischemia-reperfusion injury and Danhong injection intervention

1.3 动物模型及组织切片制备

采用Longa法^[3]建立大鼠局灶性缺血再灌注损伤模型,2h后抽出尼龙线实现再灌注。假手术组仅暴露颈总动脉,不建立缺血再灌注损伤模型。正常对照组、假手术组24h后处死,缺血再灌注组、丹红干预组按各时间点处死,选择海马CA1区常规石蜡包埋连续冠状切片。

1.4 GM130检测

1:100稀释的抗GM130多克隆抗体,采用SABC法进行免疫组织化学染色。具体操作按说明书各步骤进行。分别对切片不重叠的5个视野进行GM130阳性细胞计数,计算其平均数,每个指标用其阳性细胞的平均数作为各时间点GM130阳性细胞数。

1.5 统计学处理

使用SPSS18.0统计软件处理数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两均数比较采用LSD-t检验法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE染色观察脑组织病理学变化

光镜下正常对照组、假手术组神经细胞排列整齐,形态正常;缺血再灌注组表现为神经细胞稀疏,细胞间质空泡样改变,细胞间隙增大,胞膜与周围分界不清,不同程度的神经细胞变性坏死,其中48h组可见神经细胞肿胀,伴少量变性坏死,7天组可见大片变性及坏死的神经细胞,胞体皱缩,核固缩,核仁消失;丹红干预所有亚组表现为神经细胞变性坏死明显减少,病理损伤较缺血再灌注组轻,且丹红干预7天组神经细胞病理损伤程度明显轻于其余各时间点干预组(图1)。

2.2 高尔基体形态学变化

正常对照组、假手术组高尔基体网状结构正常;在缺血再灌注 7 天组中,高尔基体形态发生明显受损改变,网状结构缺失,淡染,颗粒减少或消失,甚至有些出现断裂;而丹红干预 7 天组,高尔基体形态基本正常(图 2)。

2.3 GM130 阳性细胞表达

正常对照组和假手术组中 GM130 呈阳性表达,均明显高于缺血再灌注各时间点组以及除丹红干预 7 天组外的其它时间点组($P < 0.05$)。缺血再灌注组随时间的推移,GM130 表达呈递减趋势,缺血再灌注 7 天组表达水平最低。丹红注射液干预后 GM130 的表达上升,其中丹红干预 7 天组 GM130 表达明显高于其余各时间点丹红干预组($P < 0.05$;图 3)。同一时间点比较,丹红干预 6 h 组 GM130 表达

与缺血再灌注组差异无显著性($t = 0.819, P = 0.427$);其余各时间点比较,丹红干预组 GM130 表达均明显高于缺血再灌注组($P < 0.05$;表 1)。

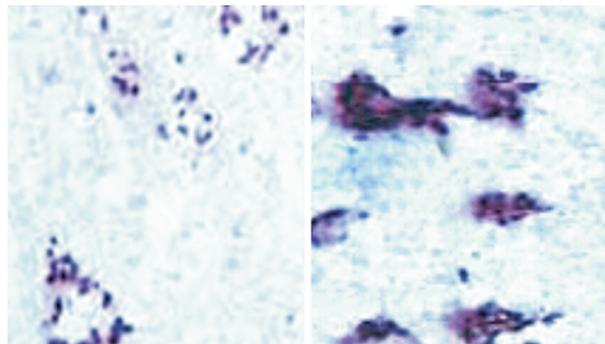


图 2. 高尔基体形态学变化($\times 400$) 左为缺血再灌注 7 天组,右为丹红干预 7 天组。

Figure 2. Morphological changes of the Golgi

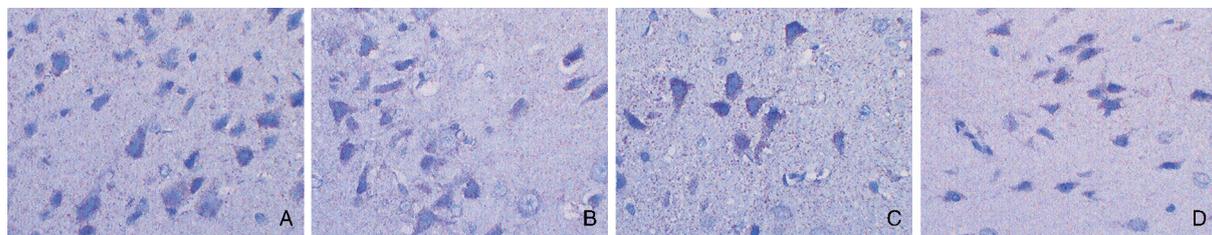


图 3. 大鼠脑缺血再灌注及丹红注射液干预后 GM130 的表达变化($\times 200$) A 为假手术组,B 为缺血再灌注 48 h 组,C 为缺血再灌注 7 天组,D 为丹红干预 7 天组。

Figure 3. Changes of GM130 expression in rats received ischemia-reperfusion injury and Danhong injection intervention

表 1. GM130 阳性细胞表达

Table 1. GM130 positive cells expression in each group

分 组	n	GM130 阳性细胞数
正常对照组	6	162.75 \pm 6.44
假手术组	6	162.88 \pm 5.97
缺血再灌注 6 h 组	6	117.12 \pm 6.79 ^{ac}
缺血再灌注 24 h 组	6	116.45 \pm 6.63 ^{ac}
缺血再灌注 48 h 组	6	113.57 \pm 5.76 ^{ac}
缺血再灌注 72 h 组	6	102.38 \pm 7.36 ^{ac}
缺血再灌注 7 天组	6	99.35 \pm 5.44 ^a
丹红干预 6 h 组	6	120.19 \pm 7.67 ^{ad}
丹红干预 24 h 组	6	126.28 \pm 8.95 ^{abd}
丹红干预 48 h 组	6	130.59 \pm 8.02 ^{abd}
丹红干预 72 h 组	6	147.94 \pm 6.89 ^{abd}
丹红干预 7 天组	6	158.73 \pm 5.75 ^b

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组和假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,与缺血再灌注组同时点比较;c 为 $P < 0.05$,与缺血再灌注 7 天组比较;d 为 $P < 0.05$,与丹红干预 7 天组比较。

3 讨 论

研究发现脑缺血再灌注后,各种损伤机制可引起多个亚细胞器超微结构的形态及功能发生变化,并且出现一系列的亚细胞应激反应^[4,5],这可作为判断神经细胞受损与否以及损伤程度的重要标志。

本实验发现缺血再灌注的时间越延长,损伤区域脑组织形态学受损表现越严重,可见大量变性及坏死的神经细胞,表现为细胞间隙增大、胞体皱缩、核固缩深染、核仁消失。丹红注射液干预时间越长,大鼠脑组织形态学改善越明显,表现为脑组织肿胀减轻,损伤范围减小,光镜下观察半暗带细胞形态大致正常,发生核固缩、核碎裂的细胞较少。这些结果表明丹红注射液可以抑制细胞凋亡的发生,具有神经保护作用,与以往研究结果相一致^[3,6]。

本实验发现缺血再灌注损伤后一定时间之内,尽管受损区域内脑组织细胞形态学已经发生了明显变化,但高尔基体形态结构并未发生明显变化,直至缺血再灌注 7 天时,高尔基体形态才发生明显受损

改变,网状结构缺失、淡染,颗粒减少或消失,甚至有些出现断裂。产生这种差异性表现的原因可能是,缺血再灌注早期,机体代偿机制尚可维持高尔基体正常形态,缺血再灌注后期,损伤发展至不可逆时,各种损伤机制(氧自由基、钙超载、炎症因子、兴奋毒性氨基酸等)呈现瀑布级联爆发式效应,高尔基体出现应激反应,其超微结构发生变化,其形态才发生明显异常变化。

GM130 是高尔基体上一个不可缺少的结构蛋白,研究表明采用基因技术使 GM130 沉默表达后,高尔基体形态出现明显变化,并能更进一步直接影响高尔基体的功能^[4]。本实验发现缺血再灌注组随时间延长,GM130 表达呈下降趋势越明显,而缺血再灌注后期高尔基体形态才发生明显变化,结果提示 GM130 表达与高尔基体形态变化存在相关性。脑缺血后神经细胞出现坏死,GM130 呈现表达逐步下降,当下降到一定程度时,高尔基体形态会发生明显损伤改变。缺血再灌注损伤时间越长,GM130 表达越低,高尔基体损伤越严重。提示 GM130 表达下降可作为高尔基体破坏的分子标志物。

研究发现丹红注射液有抗血小板聚集、扩血管和改善微循环等功效,临床上已广泛地用于缺血缺氧性疾病的治疗^[7,8],但其对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制尚不明确。本实验以丹红注射液干预后,缺血损伤区域神经细胞存活增加,坏死减少,且干预时间越长,神经元细胞存活越多,损伤越轻;高尔基体形态未出现异常。GM130 表达呈升高趋势,且干预时间越长,其表达升高越明显。以上结果表明,丹红注射液能减轻神经细胞损伤,具有保护高尔基体作用,其作用机制可能是通过上调 GM130 表达而维持高尔基体稳定性,从而发挥神经保护作用。

[参考文献]

- [1] Hu Z, Zeng L, Xie L, et al. Morphological alteration of Golgi apparatus and subcellular compartmentalization of TGF-beta1 in Golgi apparatus in gerbils following transient forebrain ischemia[J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(11): 1 927-931.
- [2] Kodani A, Sutterlin C. The Golgi protein GM130 regulates centrosome morphology and function[J]. *Mol Biol*, 2008, 19(2): 745-752.
- [3] Li J, Qu Y, Li X, et al. The role of integrin alpha (v) beta (8) in neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Neurotox Res*, 2010, 17(4): 406-417.
- [4] Puthenveedu MA, Bachert C, Puri S, et al. GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(3): 238-246.
- [5] Truettner JS, Hu K, Liu CL, et al. Subcellular stress response and induction of molecular chaperones and folding proteins after transient global ischemia in rats[J]. *Brain Res*, 2009, 1249: 9-18.
- [6] Bain JM, Ziegler A, Yang Z, et al. TGFbeta1 stimulates the over-production of white matter astrocytes from precursors of the "brain marrow" in a rodent model of neonatal encephalopathy[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9567
- [7] 王琴, 吕圭源, 刘小瑜. 丹参抗脑缺血在神经细胞、分子及递质水平的作用机制研究进展[J]. *实用药物与临床*, 2007, 10(4): 235-237.
- [8] 米秀娟, 李光勤. 丹红注射液对局灶性脑缺血大鼠神经功能恢复的影响及其机制研究[J]. *中国全科医学*, 2010, 13(3): 870-873.

(此文编辑 许雪梅)